

И.В. МАЙБОРОДИН <sup>1</sup>, Н.Ф. ФИГУРЕНКО <sup>1</sup>, А.А. ЕЛОВСКИЙ <sup>2</sup>,  
Т.В. МИХЕЕВА <sup>1</sup>, Р.В. МАСЛОВ <sup>1</sup>, В.И. МАЙБОРОДИНА <sup>3</sup>,  
А.И. ШЕВЕЛА <sup>1</sup>



## ВОЗМОЖНОСТЬ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ИНТАКТНОЙ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН <sup>1</sup>,  
Медицинский центр «Авиценна» <sup>2</sup>,  
Институт молекулярной патологии и патоморфологии,  
Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины  
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации <sup>3</sup>, г. Новосибирск,  
Российская Федерация

**Цель.** Изучить возможность развития осложнений после инъекции аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (ММСК) непосредственно в печень интактных крыс.

**Материал и методы.** Методами световой микроскопии с применением люминесценции изучали изменения печени интактных крыс после прямой инъекции ММСК с трансфицированным геном GFP и дополнительно окрашенными Vybrant® CM-Dil клеточными мембранами.

**Результаты.** После введения ММСК обширные скопления, депо введенных клеточных элементов в печени отсутствовали у всех животных даже через 1 неделю. В некоторых случаях, до 1/3 наблюдений, в органе развивалось асептическое воспаление, признаками которого являлись расширение и полнокровие синусоидов, возрастание численности нейтрофилов в их просвете, участки некрозов паренхимы и лимфо-гистиоцитарные инфильтраты. На 3-й неделе в печени появлялись длинные тонкие прослойки соединительной ткани, расширяющиеся в области сосудов и содержащие большое количество сидерофагов. К 4-й неделе указанные морфологические изменения печени нормализовались. На протяжении всего эксперимента ни в одном случае не произошло дифференцировки введенных ММСК в клетки печени.

**Заключение.** Основными причинами выявленных изменений являются повреждение паренхимы печени при инъекции взвеси клеточных элементов под давлением, а также присутствие самих ММСК и их детрита. При инъекционном введении шприцем под давлением взвесь ММСК раздвигает и разрывает паренхиму печени по ходу сосудов. Введенные ММСК, часть из которых быстро погибает из-за резкого изменения условий жизнедеятельности, а также содержащийся вместе с ними детрит непосредственно вызывают миграцию макрофагов к месту инъекции и фактически являются причиной асептического воспалительного процесса. ММСК быстро элиминируются из места инъекции в печени макрофагами, а также посредством кровеносного и лимфатического русел, тогда как протекающая воспалительная реакция повреждает клетки печени и служит причиной обнаруженных изменений.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, печень, воспаление, некроз, животные, эксперимент

**Objective.** To study the possibility of complications development after the injection of the autologous multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow origin (MMSC) directly in the intact liver of rats.

**Methods.** The changes of the rat liver after the direct injection of MMSC with a transfected GFP-gene and additionally stained cellular membranes by Vybrant® CM-Dil were investigated by the methods of light microscopy with luminescence application.

**Results.** After the MMSC injections, the extensive congestions, depot of the injected cells in the liver were absent in all animals even after a week. In some cases, up to 1/3 observations, the aseptic inflammation manifested by the dilation and hyperemia of sinusoids, an increase of neutrophil number in the sinusoids, necroses of parenchyma and lympho-histiocytic infiltrates were developed in the organ. Long thin layers of the connective tissue extending in the vessel region and containing a large number of siderophages appeared in the liver during the 3rd week. By the 4th week the specified liver morphological changes have normalized. Throughout the experiment there was no any differentiation of injected MMSC to the liver cells.

**Conclusions.** The main causes of the revealed changes are the damage of the liver parenchyma at the cell suspension injection under pressure and also direct presence of MMSC and their detritus. At the syringe under pressure the MMSC suspension moves apart and lacerates the liver parenchyma along the vessels. Injected MMSC, some of which quickly perishes due to a dramatic change in living conditions, and also the detritus which is present

together with them, immediately cause migration of macrophages to the site of injection and actually are the reason of aseptic inflammatory process. MMSC are quickly eliminated from the injection site in the liver by macrophages and also by means of vascular and lymphatic beds whereas the proceeding inflammatory reaction damages the liver cells and serves as the cause of the revealed changes.

*Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, liver, inflammation, necrosis, animals, experiment.*

**Novosti Khirurgii. 2019 Jan-Feb; Vol 27 (1): 5-15**

**Possibility of Inflammatory Injuries Development in Intact Liver after the Multipotent Stromal Cell Injection in Experiment**

**I.V. Maiborodin, N.F. Figurenko, A.A. Elovskiy, T.V. Mikheeva, R.V. Maslov, V.I. Maiborodina, A.I. Shevela**

The articles published under CC BY NC-ND license



### **Научная новизна статьи**

Впервые изучено состояние интактной печени после прямой инъекции в орган аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения. Установлено, что в печени развивалось асептическое воспаление, признаками которого являлись возрастание численности нейтрофилов в просвете синусоидов, участки некрозов паренхимы и лимфогистиоцитарные инфильтраты. На протяжении всего эксперимента ни в одном случае не произошло дифференцировки введенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в клетки печени.

### **What this paper adds**

For the first time the state of an intact liver after a direct injection of the autologous multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow origin (MMSC) in the organ has been studied. The aseptic inflammation has been found out to develop, confirmed by the increase of neutrophil number in sinusoids, necroses of the parenchyma and lympho-histiocytic infiltrates. Throughout the experiment the differentiation of the injected MMSC to the liver cells was not registered.

### **Введение**

Печеночная недостаточность является серьезным клиническим синдромом с неблагоприятным прогнозом. Трансплантация мультипотентных стромальных клеток (МСК) является новым фактором воздействия на недостаточность функций печени. В литературе показаны преимущества применения МСК при заболеваниях печени [1, 2].

Согласно литературным данным, клеточная терапия снижает активность воспалительной реакции. МСК накапливаются в печени у мышей во время острой инфекции вирусом гепатита В, при этом снижается повреждение органа, связанное с вирусной инфекцией, о чем свидетельствует сокращение уровня АлАТ, уменьшение секреции провоспалительных цитокинов и снижение воспалительной инфильтрации. Использование МСК ограничивает иммуноопосредованное повреждение печени через супрессию активности натуральных клеток-киллеров [1].

Традиционно признано, что при патологии печени МСК проявляют свое терапевтическое влияние главным образом посредством трансдифференцировки в гепатоциты и непаренхиматозные клеточные элементы органа. Кроме того, МСК, при печеночной недостаточности вследствие ишемических и реперфузионных повреждений, перед трансдифференцировкой секретируют различные трофические и иммуномодулирующие факторы, уменьшающие выраженность патологических изменений и снижающие активность воспалительного ответа [2].

Вместе с этим, все работы, посвященные

влиянию МСК и их экзосом на печень и сообщающие о хорошей терапевтической эффективности клеточной терапии, не содержат данных ни о каких возможных осложнениях и побочных эффектах применения МСК.

**Цель.** Изучить возможность развития осложнений после инъекции аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения (ММСК) непосредственно в печень интактных крыс.

### **Материал и методы**

Работа основана на результатах морфологического исследования изменений печени крыс-самцов инбредной линии Wag весом 180–200 г в возрасте 6 месяцев в разные сроки после прямой инъекции ММСК в центр левой доли печени (lobus hepatis sinistra). Все манипуляции с крысами осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.; Приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г.).

### **Получение, характеристика и подготовка ММСК для инъекции в печень в эксперименте**

ММСК были получены вследствие забора костного мозга из бедренных костей, биоптированных под эфирной анестезией у крыс-самцов вышеуказанной линии. Клетки суспендировали

и помещали в пластиковые сосуды («Nunk», Дания), через 2 суток культивирования неприкрепившиеся клеточные элементы сливали вместе со средой. Адгезированные к пластику клетки культивировали в среде  $\alpha$ -МЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biolog», Россия) в условиях насыщенной влажности в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе с 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C. Замену культуральной среды осуществляли один раз в 3 суток. В процессе субкультивирования клеточную культуру в виде монослоя пересеивали в плотности от 1000 до 5000 клеток/см<sup>2</sup> (в зависимости от ростовых свойств применяемой эмбриональной сыворотки), применяли растворы Версена и трипсина в стандартных концентрациях.

Методами просвечивающей световой и люминесцентной микроскопии, а также цитологическими способами было подтверждено, что культивируемые костномозговые клеточные элементы

- имеют поверхностные антигены CD105+, CD90+, CD45-, CD34-;
- во время культивирования *in vitro* адгезируются к поверхности пластика;
- на протяжении всего времени культивирования остаются фибробластоподобными;
- не меняются в процессе культивирования на протяжении нескольких генераций;
- образуют колонии фибробластоподобных клеточных элементов при низкой плотности в начале культивирования.

Вместе с этим, морфологические, фенотипические и физические характеристики не могут служить окончательными специфическими критериями, применяемыми для точной идентификации, что выделенные клеточные элементы являются МСК. МСК могут иметь разный внешний вид, это связано главным образом с методами их выделения и культивирования. В связи с этим перед введением МСК целесообразно тестирование на возможность дифференцировки в определенные клеточные линии. Возможность МСК к направленной дифференцировке в клеточные элементы костной, жировой и хрящевой тканей (трехлинейная дифференцировка) *in vitro* служит единственным требованием, согласно литературным данным, для подтверждения, что имеющиеся стромальные клетки являются мультипотентными.

Индукция остеогенной дифференцировки ММСК *in vitro*.

Так как МСК могут дифференцироваться в клеточные элементы костных тканей и условия ее прохождения максимально часто воспроизводятся другими исследователями, это направление дифференцировки используют как рутин-

ный метод *in vitro* для спецификации культур МСК, и он является типичным, по умолчанию заданным путем направления развития для большего числа культивируемых МСК. С целью запуска дифференцировки ММСК в костную ткань применяли 0,1  $\mu\text{M}$  раствор дезоксиметазона, 50  $\mu\text{M}$  раствор аскорбиновой кислоты и 10 mM раствор  $\beta$ -глицерофосфата (все реактивы производства «Sigma», США), активирующие дифференцировку в направлении клеточных элементов костных тканей.

Остеогенную дифференцировку определяли по 2 признакам: активности щелочной фосфатазы и появлению ионов кальция в экстрацеллюлярном матриксе. Цитохимическое выявление щелочной фосфатазы проведено с использованием нитротетразолиевого синего в присутствии субстрата щелочной фосфатазы 5-бromo-4-хлоро-3-индолила. Отложение солей кальция в экстрацеллюлярном матриксе регистрировали окрашиванием Ализарином красным.

ММСК 2 пассажа, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA), содержащие ген зеленого флуоресцентного белка GFP (характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 нм (основной) и 475 нм (минорный) и пиком флуоресценции на 498 нм), под контролем промотора цитомегаловируса и ген устойчивости к неомицину под контролем промотора вируса SV40, необходимого для последующей селекции с использованием дженетицина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., USA). Трансфекцию проводили в присутствии реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Canada) согласно рекомендациям производителя, применяли протокол для трансфекции суспензионных клеток. Трансфекцию проводили, используя  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента для трансфекции (TurboFect) [3].

Кроме того, клеточные мембраны ММСК были окрашены раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, USA) (максимальная абсорбция на 553 нм, эмиссия на 570 нм), который окрашивает мембраны живых суспензионных или прикрепившихся клеток. Через 2 часа после трансфекции плазмидной ДНК белка GFP к суспензии ММСК добавляли краситель Vybrant® CM-Dil из расчета 5 мкл раствора на  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл среды без сыворотки, мягко тщательно перемешивали пипетированием и оставляли на 20 мин в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37°C в условиях насыщенной влажности. Затем ММСК центрифугировали 5 мин при 1500 оборотов в 1 мин, среду с красителем удаляли, к ММСК добавляли новую порцию теплой среды.

Данную процедуру удаления красителя проводили 3 раза. Затем ММСК ресуспензировали в теплой среде из расчета  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл [3]. Процент жизнеспособных клеток перед введением составлял 92-98%.

#### **Хирургическое вмешательство при инъекции ММСК в печень.**

Под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил асептики и антисептики, после обработки кожи спиртом скальпелем производили срединную лапаротомию длиной 1,5-2 см. В центр левой доли печени на глубину 1-2 мм инсулиновым шприцем вводили 100 мкл суспензии ММСК ( $1 \times 10^6$  клеток с жизнеспособностью не менее 92% в 1 мл) в теплом физиологическом растворе на бифосфатном буфере (рН 7,4). Гемостаз не применяли, сразу после инъекции ММСК послойно ушивали переднюю брюшную стенку викрилом и обрабатывали швы 5% спиртовым раствором йода. Гибели животных от хирургического вмешательства не было, гнойно-воспалительные осложнения в месте операции не отмечены. В качестве контроля использовали ложнооперированных (только лапаротомия) и интактных животных. На каждую точку исследования было использовано 12 крыс (всего 132 особи).

#### **Подготовка материала для изучения морфологическими методами.**

Спустя 1, 2, 3, 4 и 5 недель после введения ММСК животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза, левую долю печени фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, для оценки количества и распределения макрофагов на срезах проводили непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами против CD68-антигена в соответствии с рекомендациями производителя антител: использовали набор реагентов "Dako" (Дания), изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз.

Также неокрашенные срезы исследовали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450-490 нм, диапазон регистрации 515-∞ нм) или для родамина (Rhod — диапазон возбуждения 540-552 нм, диапазон регистрации 575-640 нм). При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию. В процессе совмещения изображений с приме-

нием фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвет в зависимости от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает более яркая флюоресценция при использовании фильтра Alexa Fluor 488, красный цвет получается на фоне применения родаминового фильтра, желтый и его оттенки в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции.

### **Результаты**

Через 1 неделю в месте введения ММСК и недалеко от него было обнаружено только расширение и полнокровие синусоидов. Иногда можно было отметить возрастание численности сегментоядерных клеточных элементов в просвете некоторых синусоидов и сосудов (рис. 1 А, 1 Б).

На таких участках при использовании люминесцентной микроскопии были найдены небольшие скопления расположенных поодиночке клеточных элементов разной формы размером до 10 мкм с более интенсивным свечением при установке фильтра для родамина, чем при использовании фильтра Alexa Fluor 488, что, при совмещении изображений, полученных с указанными фильтрами, визуализируется как оранжевый или красный цвет (рис. 1 В). На некотором удалении от места инъекции ММСК в паренхиме печени также встречались единичные подобные объекты. Клеточные элементы с яркой красной флюоресценцией в основном были расположены по ходу синусоидов (рис. 1 В). Во всех интенсивно люминесцирующих клетках светилась не вся цитоплазма, а четко очерченные овальные цитоплазматические включения различного диаметра. Ни в одном случае не было найдено значительных скоплений, депо клеточных элементов с более яркой флюоресценцией при использовании родаминового фильтра.

Иммуногистохимическое исследование срезов печени с использованием моноклональных антител против антигена CD68 показало преимущественное расположение клеток макрофагального ряда (клеток Купфера) по ходу синусоидов и рядом с сосудами (рис. 1 Г).

На 2-й неделе после инъекции ММСК в печень в 2 случаях из 12 в паренхиме органа были найдены участки некрозов, в одном случае такое место было имbibировано эритроцитами (рис. 2 А). Еще у 3 крыс отметили некробиотические изменения отдельно расположенных гепатоцитов с формированием мелких лимфогистиоцитарных инфильтратов и высоким содержанием сегментоядерных клеточных элементов в просвете



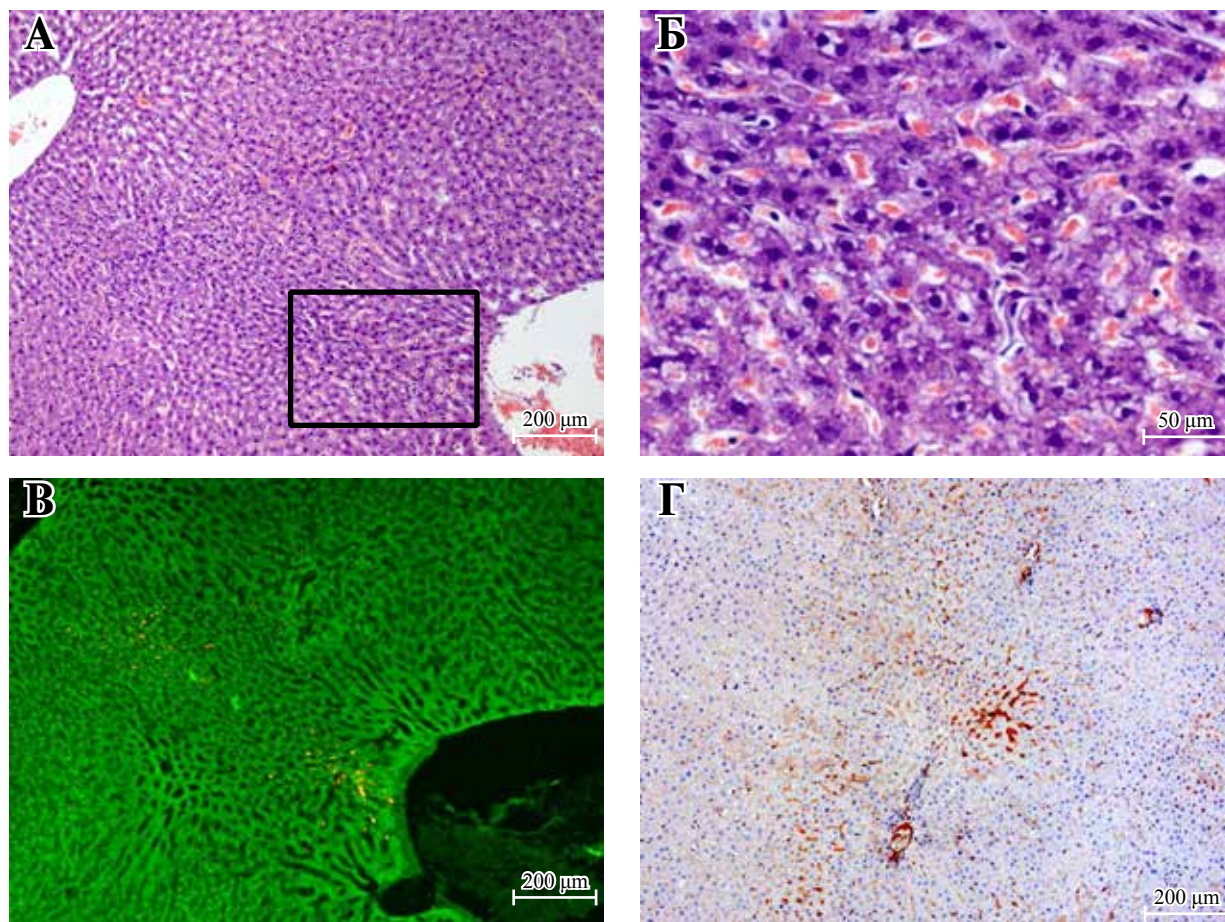


Рис. 1. Печень крыс через 1 неделю после введения ММСК.

А — Балочная структура сохранена, синусоиды расширены. Окраска — гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 50$ . Б — Фрагмент рис. 1А. Расширение и гиперемия синусоидов, значительное увеличение численности эндотелиальных и купферовских клеток. Окраска — гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 200$ . В — Небольшие скопления расположенных поодиночке клеточных элементов с интенсивным красным свечением в условиях применения родаминового фильтра. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина. Ув.  $\times 50$ . Г — Все макрофаги расположены рядом с сосудами или вытянуты по ходу синусоидов. Иммуногистохимическая реакция с антителами против антигена CD68. Окраска — диамидобензидином и гематоксилином. Ув.  $\times 50$ .

синусоидов (рис. 2 Б). В паренхиме органа было обнаружено яркое красное свечение только единичных клеток, расположенных как возле сосудов, так и вдали от них (рис. 2 В, 2 Г).

У 3 из 12 животных спустя 3 недели после использования ММСК в паренхиме печени были найдены длинные тонкие прослойки соединительной ткани, расширяющиеся в области сосудов и содержащие большое количество крупных клеточных элементов (более 30 мкм) с коричневым пигментом в цитоплазме (рис. 3 А, 3 Б). Флюоресценция таких клеток была очень яркой, но чаще всего не отличалась по интенсивности и при установке родаминового фильтра, и на фоне применения фильтра Alexa Fluor 488 (рис. 3 В). Однако в некоторых клетках, иногда сконцентрированных возле сосудов, единичные включения светились все-таки интенсивнее в условиях использования фильтра для родамина (рис. 3 Г).

Морфологически печень животных через 4 и 5 недель после введения ММСК практически не отличалась от состояния в группе интактного контроля. Только в результате тщательного поиска на 4-й неделе было обнаружено несколько объектов с интенсивной флюоресценцией на фоне применения родаминового фильтра, эти объекты были небольшими, чаще пылевидными, имели правильную круглую форму и четкие границы. Причем такие светящиеся структуры не являлись артефактами, так как были расположены непосредственно в плоскости среза и их резкость менялась вместе с резкостью печеночной паренхимы.

Считаем необходимым особо обратить внимание, что ни в одном наблюдении не было найдено дифференцировки введенных ММСК в гепатоциты: в последних никогда не было отмечено как свечения протеина GFP, так и присутствия мембранного красителя Vybrant® CM-DiI.

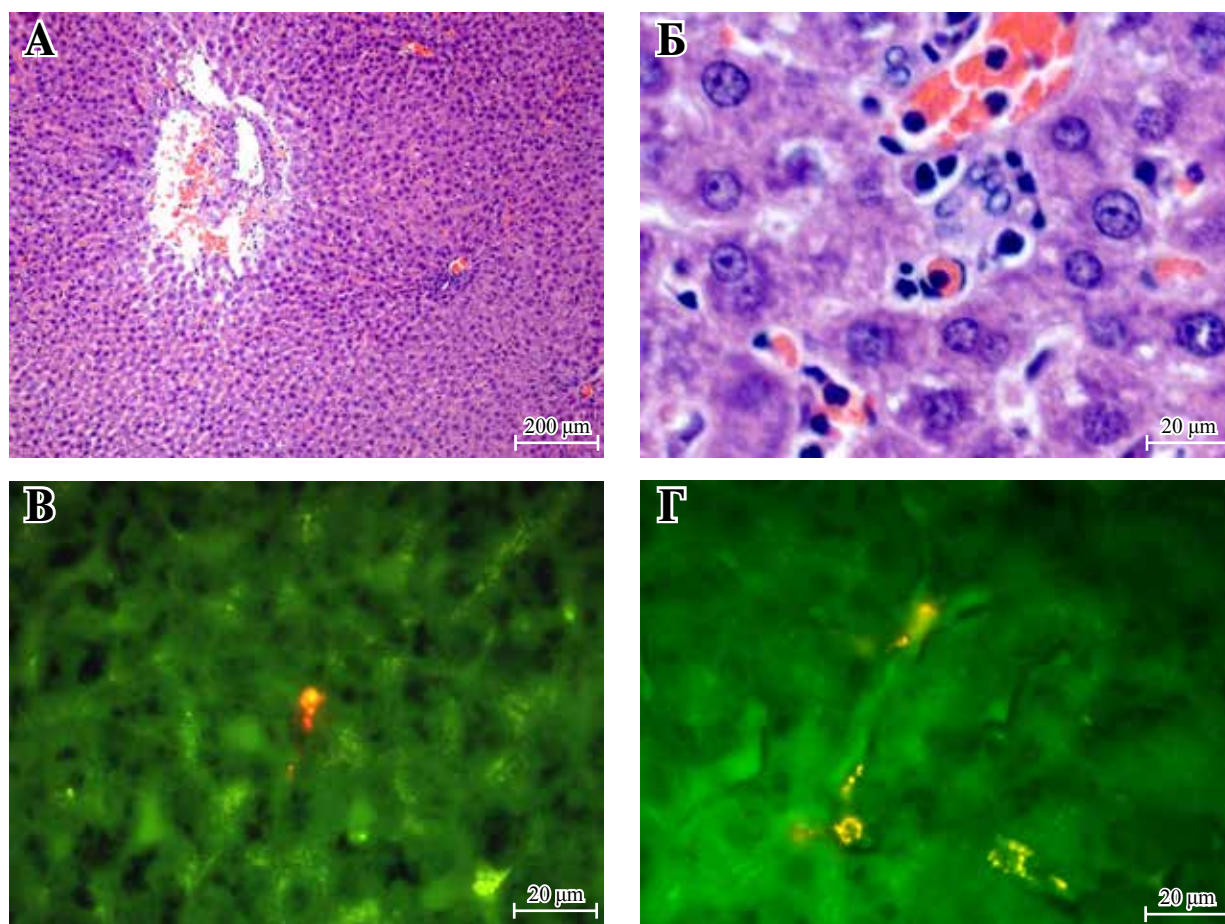


Рис. 2. Печень животных спустя 2 недели после инъекции ММСК.

А – Участок некроза с пропитыванием паренхимы форменными элементами крови, полнокровные синусоиды. Окраска – гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 50$ . Б – Некроз единичных гепатоцитов с формированием макрофагально-лимфоцитарных инфильтратов, увеличение численности лейкоцитов в просвете сосудов. Окраска – гематоксилин-эозин. Ув.  $\times 500$ . В – Клетка в паренхиме органа вдали от сосудов значительно ярче флюоресцирует красным цветом на фоне применения родаминового фильтра. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина. Ув.  $\times 500$ . Г – В клеточных элементах, расположенных по ходу синусоидов, в условиях использования родаминового фильтра ярко светятся мелкие цитоплазматические включения, часто расположенные вокруг ядра. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина. Ув.  $\times 500$ .

### Обсуждение

Ожидалось, что после инъекции ММСК будут найдены их скопления в паренхиме печени. Очевидно, что отсутствие депо клеточных элементов, интенсивно светящихся при использовании фильтра для родамина, свидетельствует о практически полной элиминации ММСК из нормальной печени к окончанию 1-й недели. Вместе с этим существует вероятность, что участок с максимальным объемом ММСК, депо ММСК, просто не попал в плоскость среза, но, учитывая количество животных в группе, а также число срезов с каждого образца (3–5), такое предположение кажется маловероятным. ММСК не задерживаются в неповрежденной печени с неизменной микроциркуляцией и без исходного

воспаления. Доказательством того, что ММСК при инъекции все-таки попали в печень, служит присутствие расположенных поодиночке интенсивно флюоресцирующих объектов в паренхиме, а также многочисленные признаки асептического воспалительного процесса: геморрагии и гиперемия синусоидов, некроз групп и отдельных гепатоцитов, увеличение численности макрофагов и сегментоядерных нейтрофилов, формирование лейкоцитарных инфильтратов и развитие соединительной ткани.

Каким образом введенные ММСК были удалены из места инъекции и куда они активно или пассивно мигрировали в жизнеспособном виде или в качестве детрита, на данный момент точно судить невозможно. Но можно предположить проникновение их в ток крови по синусо-



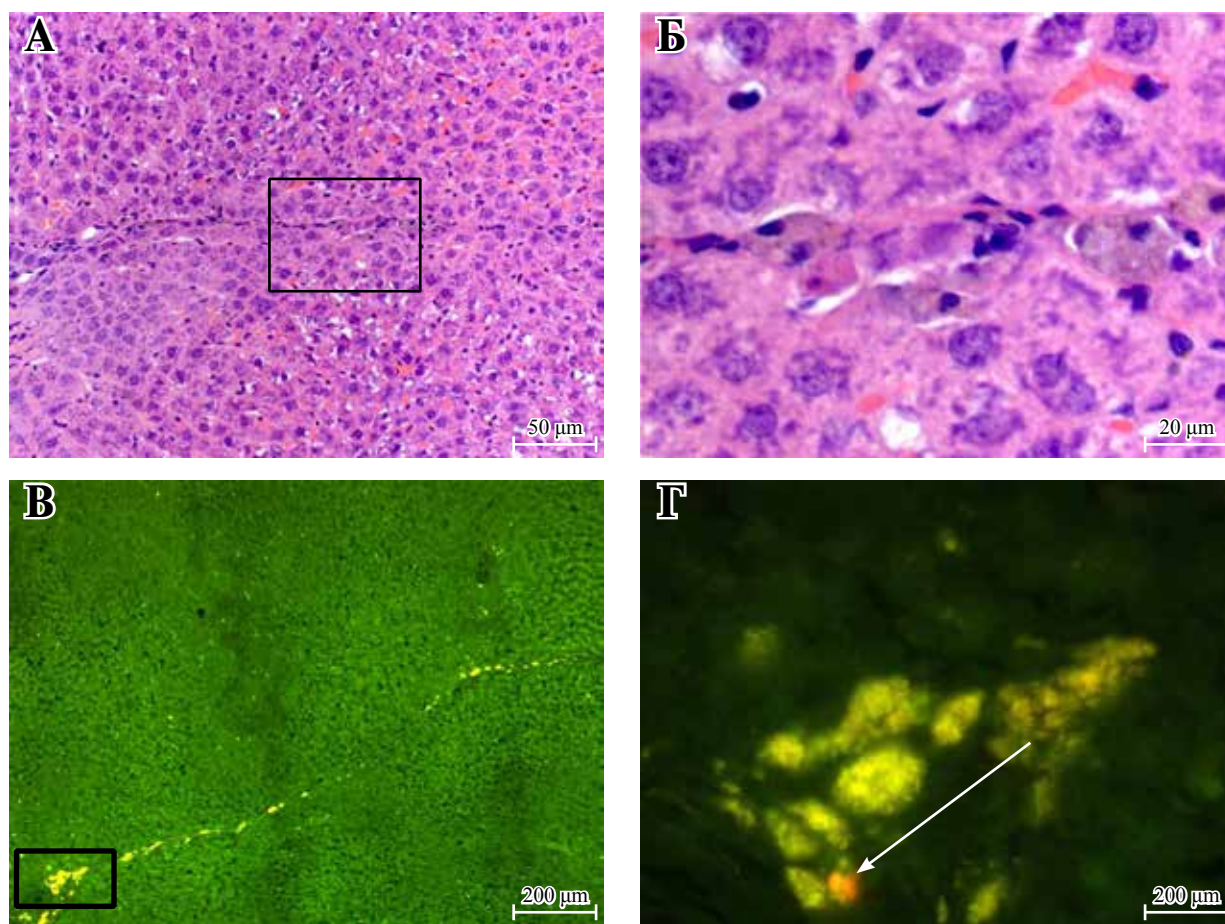


Рис. 3. Состояние печени на 3-й неделе после использования ММСК.

А – Тонкая прослойка соединительной ткани проходит через паренхиму. Окраска – гематоксин-эозин. Ув.  $\times 200$ . Б – Фрагмент рис. 3а. Соединительнотканная прослойка содержит много крупных клеток с коричневым пигментом в цитоплазме. Окраска – гематоксин-эозин. Ув.  $\times 500$ . В – Тонкая прослойка со светящимися объектами, выстроенными в один ряд, проходит через паренхиму, в области сосудов флюоресцирующих структур больше и они расположены в несколько рядов. Свечение практически одинаковой интенсивности в условиях применения родаминового фильтра и при использовании фильтра Alexa Fluor 488. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa Fluor 488 и для родамина. Ув.  $\times 500$ . Г – Фрагмент рис. 3В. Очень крупные клеточные элементы с флюоресцирующими цитоплазматическими включениями расположены возле сосуда в несколько рядов. Свечение большинства клеток практически одинаковой яркости и при использовании фильтра для родамина, и при установке фильтра Alexa Fluor 488. Вместе с этим в одном случае включения в цитоплазме флюоресцируют более интенсивно красным цветом в условиях применения родаминового фильтра (стрелка). Ув.  $\times 500$ .

идам и диссеминацию таким образом по всему организму или фагоцитоз макрофагами с последующей их миграцией также в кровеносное русло или регионарные лимфатические узлы [3] с возможностью инициации там иммунной защиты против самих ММСК или каких-то их компонентов.

Клеточные элементы со свечением, расположенные в паренхиме поодиночке и небольшими группами, скорее всего, являются макрофагами (клетками Купфера), самостоятельно фагоцитировавшими ММСК и их окрашенный детрит и в результате этого получившими способность к флюоресценции. В пользу того, что клетки, ярко светящиеся красным цветом при использовании фильтра для родамина, явля-

ются макрофагами, свидетельствуют несколько фактов.

1. Расположение по ходу синусоидов и рядом с сосудах – типичное расположение печеночных макрофагов. Это еще раз подтверждено иммуногистохимическим исследованием с использованием моноклональных антител против антигена CD68.

2. Разные размеры и формы клеточных элементов. Купферовские клетки на гистологических срезах имеют звездчатую или вытянутую форму.

3. Светится не вся цитоплазма клеток, а четко очерченные овальные цитоплазматические включения разных размеров, являющиеся, скорее всего, лизосомами.

В литературе есть данные, что макрофаги могут светиться при облучении ультрафиолетовым светом за счет аутофлюоресценции [4, 5] или фагоцитоза флюоресцентных веществ [6, 7, 8], в том числе МСК [3]. Однако аутофлюоресценция клеток макрофагального ряда дает практически одинаковое свечение при установке фильтров Alexa Fluor 488 или для родамина.

Введенные ММСК являются аутологичными, генетически идентичными, но все-таки могут отличаться от клеток организма-донора вследствие каких-то биохимических, физиологических или других свойств, изменившихся в результате культивирования [3]. Кроме того, ММСК содержат в геноме ДНК белка GFP, а в цитоплазме сам протеин, и ДНК и белок GFP являются чужеродными и могут вызвать реакции системы иммунитета. Кроме того, для трансфекции ДНК белка GFP был применен вирусный вектор, его фрагменты, сохраняющиеся в клетках-мишенях (ММСК), тоже могут выступать в качестве антигена, спровоцировать включение иммунных механизмов и уничтожение инъецированных ММСК. В литературе есть данные, что после введения в ткани МСК очень быстро погибают вследствие резкого изменения условий жизнедеятельности [9, 10]. А. Babaei et al. [11] отмечают, что агрегаты стволовых клеток и клеток-предшественников, полученные из костного мозга и способные к восстановлению гемопоэтической системы после гамма-облучения, после введения непосредственно в печень на фоне ее недостаточности полностью исчезали к 15-му дню.

Не исключено, что в процессе фагоцитоза детрита и самих введенных ММСК в макрофагах может оказаться и белок GFP и его ДНК. Это может обеспечить интенсивное свечение фагоцитов зеленым цветом при облучении ультрафиолетовым светом с использованием фильтра Alexa Fluor 488 и отсутствие свечения в условиях применения фильтра для родамина. Кроме трансфекции генома белка GFP, мембраны ММСК дополнительно были окрашены красителем Vybrant® CM-DiI. При поглощении таких ММСК и накоплении в лизосомах окрашенных фрагментов макрофаги могут начать интенсивно флюоресцировать красным цветом в условиях применения родаминового фильтра при отсутствии свечения на фоне использования фильтра Alexa Fluor 488.

Существует вероятность, что при макрофагальном лизисе ММСК ДНК белка GFP и сам этот протеин быстро деградируют, а Vybrant® CM-DiI или не разрушается ферментами лизосом, или разрушается очень медленно. В результате происходит накопление мембранного кра-

сителя в макрофагах, тем более, что эти клетки способны фагоцитировать не одну ММСК, а несколько. Если при постепенной деструкции уже поглощенных клеток процесс фагоцитоза продолжается, концентрация Vybrant-CM-DiI в фагоцитах может оказаться очень большой. Возможно, что Vybrant-CM-DiI не просто накапливается в макрофагах, а также окрашивает и их мембраны. Таким образом, макрофаги приобретают способность к интенсивной красной флюоресценции при облучении ультрафиолетовым светом с фильтром для родамина. И это свечение может быть значительно более выраженным, чем у инъецированных ММСК.

Возможно, что введенные ММСК, часть из которых быстро погибает из-за резкого изменения условий жизнедеятельности [9, 10, 11], а также содержащийся вместе с ними детрит непосредственно вызывают миграцию макрофагов к месту инъекции и фактически являются причиной асептического воспалительного процесса вследствие секреции провоспалительных цитокинов [12]. Следует отметить и наличие публикаций, которые, наоборот, сообщают о стихании воспаления в печени после введения МСК или их экзосом [1, 2]. ММСК быстро элиминируются из места инъекции в печени макрофагами, а также посредством кровеносного и лимфатического русел [3], тогда как протекающая воспалительная реакция повреждает клетки печени и служит причиной обнаруженных изменений.

При воспалении происходит выброс большого объема биологически активных веществ, меняющих кровоток, микроциркуляцию и сосудистую проницаемость. Все это приводит к найденным кровоизлияниям, некрозу групп и единичных гепатоцитов, гиперемии, часто выраженной, и увеличению численности макрофагов, которые вместе с лимфоцитами и иногда нейтрофилами образуют скопления (инфильтраты) в месте гибели клеточных элементов органа.

Не исключено, что при инъекционном введении шприцем под давлением взвесь ММСК раздвигает и разрывает паренхиму печени. Разрывы паренхимы происходят по ходу сосудов, так как периваскулярная клетчатка представляет собой рыхлую волокнистую соединительную ткань. В процессе такого повреждения печени происходит нарушение целостности кровеносных сосудов и образуются геморагии. Скорее всего, соединительнотканые прослойки, найденные в паренхиме печени некоторых животных, являются рубцом, сформированным в месте повреждения ткани печени и развития воспаления после введения ММСК под



давлением. А крупные коричневые клеточные элементы, присутствующие в таких прослойках в большом количестве, являются сидерофагами, фагоцитировавшими эритроциты, оказавшиеся в ткани печени при повреждении ее сосудов. По-видимому, сидерофаги в данном случае флюоресцируют очень ярко за счет фагоцитированного гемосидерина [8], но вследствие этого обнаруженное свечение имеет практически одинаковую интенсивность в условиях применения фильтров Alexa Fluor 488 или для родамина. Иногда в таких фагоцитах с коричневым пигментом, наряду с гемосидерином, содержится и детрит самих введенных ММСК, на что указывает красная флюоресценция отдельных включений.

Начиная с 3-й недели после инъекции ММСК резко уменьшается численность объектов с преимущественной флюоресценцией при использовании родаминового фильтра. Постепенно из паренхимы печени исчезают макрофаги с детритом ММСК, окрашенным Vybrant® CM-DiI и, соответственно, придающим способность фагоцитам светиться при облучении ультрафиолетовым светом через фильтр для родамина. Остается невыясненной причина исчезновения таким образом светящихся макрофагов: миграция в другие органы и ткани, деструкция мембранного красителя с потерей им флюоресцентных способностей или постепенное снижение концентрации Vybrant® CM-DiI до минимальных значений вследствие передачи, разделения нелизированного детрита с другими фагоцитами [13].

Найденные на 4-й неделе единичные овальные объекты с четкими границами и очень интенсивным свечением при использовании фильтра для родамина, скорее всего, являются депозитами красителя Vybrant® CM-DiI, оказавшимися непосредственно в паренхиме после гибели, деструкции и элиминации введенных меченных им ММСК, или распада макрофагов, фагоцитировавших такой детрит ММСК. В пользу чистого красителя, а не окрашенных клеточных элементов или их детрита, свидетельствует полное отсутствие свечения подобных объектов при использовании фильтра Alexa Fluor 488.

### Заключение

Таким образом, на основании вышеизложенного, можно сделать заключение, что после инъекции ММСК в печень интактных крыс обширные скопления, депо введенных клеточных элементов через 1 неделю отсутствуют у всех животных. В некоторых случаях, до 1/3

наблюдений, в печени развивается асептическое воспаление, признаками которого являются микроциркуляторные расстройства, такие как расширение и полнокровие синусоидов, возрастание численности сегментоядерных клеточных элементов в просвете синусоидов и некоторых сосудов, а также участки некрозов паренхимы и лимфогистиоцитарные инфильтраты. Затем, на 3-й неделе, в печени появляются длинные тонкие прослойки соединительной ткани, расширяющиеся в области сосудов и содержащие большое количество крупных клеточных элементов с коричневым пигментом в цитоплазме. Далее все изменения нормализуются, и на 4-й и 5-й неделях морфологически печень животных практически не отличается от состояния у крыс из группы интактного контроля. Основными причинами обнаруженных изменений являются повреждение паренхимы печени при инъекции ММСК под давлением, когда взвесь клеточных элементов раздвигает и разрывает паренхиму печени по ходу сосудов, а также присутствие самих ММСК с трансфицированной ДНК белка GFP и их детрита, которые могут вызвать миграцию макрофагов к месту инъекции и быть причиной асептического воспалительного процесса. На протяжении всего эксперимента ни в одном случае не было найдено дифференцировки введенных ММСК в клетки печени.

### Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья».

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

### Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Qu M, Yuan X, Liu D, Ma Y, Zhu J, Cui J, Yu M, Li C, Guo D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate immune-mediated liver injury and compromise virus control during acute hepatitis

- b virus infection in mice. *Stem Cells Dev.* 2017 Jun 1;26(11):818-27. doi: 10.1089/scd.2016.0348
2. Haga H, Yan IK, Borrelli DA, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, Lee DD, Patel T. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2017 Jun;23(6):791-803. doi: 10.1002/lt.24770
  3. Майбородин ИВ, Морозов ВВ, Аникеев АА, Фигуренко НФ, Маслов РВ, Частикин ГА, Матвеева ВА, Майбородина ВИ. Макрофагальный ответ у крыс на введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в регион хирургической травмы. *Новости Хирургии.* 2017;25(3):233-41. doi: 10.18484/2305-0047.2017.3.233
  4. Li F, Yang M, Wang L, Williamson I, Tian F, Qin M, Shah PK, Sharifi BG. Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: a lesson learned from flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2012 Dec 14;386(1-2):101-7. doi: 10.1016/j.jim.2012.08.014
  5. Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppo M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V, Melgarejo V, Correia M, Navarro M, Carretero A, Tafuro S, Rodriguez-Baeza A, Esperanza-Pina JA, Bosch F, Ruberte J. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):5997-6005. doi: 10.1167/iovs.09-3515
  6. Lei L, Tzekov R, Tang S, Kaushal S. Accumulation and autofluorescence of phagocytized rod outer segment material in macrophages and microglial cells. *Mol Vis.* 2012;18:103-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265176>
  7. Luhmann UF, Robbie S, Munro PM, Barker SE, Duran Y, Luong V, Fitzke FW, Bainbridge JW, Ali RR, MacLaren RE. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):5934-43. doi: 10.1167/iovs.09-3462
  8. Mitchell AJ, Pradel LC, Chasson L, Van Rooijen N, Grau GE, Hunt NH, Chimini G. Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. *J Leukoc Biol.* 2010 Sep;88(3):597-603. doi: 10.1189/jlb.0310184
  9. Liu S, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, Yu C, Jin Y. Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2014 Oct;134(10):2648-57. doi: 10.1038/jid.2014.169
  10. Yates CC, Nuschke A, Rodrigues M, Whaley D, Dechant JJ, Taylor DP, Wells A. Improved transplanted stem cell survival in a polymer gel supplemented with tenascin c accelerates healing and reduces scarring of murine skin wounds. *Cell Transplant.* 2017 Jan 24;26(1):103-13. doi: 10.3727/096368916X692249
  11. Babaei A, Katoonizadeh A, Ranjbar A, Naderi M, Ahmadbeigi N. Directly injected native bone-marrow stem cells cannot incorporate into acetaminophen-induced liver injury. *Biologicals.* 2018 Mar;52:55-58. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.12.006
  12. Abdelhamid L, Hussein H, Ghanem M, Eissa N. Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci.* 2017 Oct;114:225-232. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.006
  13. Гаврилин ВН, Шкурупий ВА. Влияние накопления поливинилпирролидона в синусоидальных клетках печени на характер токсического повреждения органа. *Бюл СО РАМН.* 1995;15(2):24-28.

## REFERENCES

1. Qu M, Yuan X, Liu D, Ma Y, Zhu J, Cui J, Yu M, Li C, Guo D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate immune-mediated liver injury and compromise virus control during acute hepatitis b virus infection in mice. *Stem Cells Dev.* 2017 Jun 1;26(11):818-27. doi: 10.1089/scd.2016.0348
2. Haga H, Yan IK, Borrelli DA, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, Lee DD, Patel T. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2017 Jun;23(6):791-803. doi: 10.1002/lt.24770
3. Maiborodin IV, Morozov VV, Anikeev AA, Figurenko NF, Maslov RV, Chastikin GA, Matveeva VA, Maiborodina VI. Macrophage reaction to multipotent mesenchymal stromal cells introduction into surgical trauma site in rats. *Novosti Khirurgii.* 2017;25(3):233-41. doi: 10.18484/2305-0047.2017.3.233 (in Russ.)
4. Li F, Yang M, Wang L, Williamson I, Tian F, Qin M, Shah PK, Sharifi BG. Autofluorescence contributes to false-positive intracellular Foxp3 staining in macrophages: a lesson learned from flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2012 Dec 14;386(1-2):101-7. doi: 10.1016/j.jim.2012.08.014
5. Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppo M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V, Melgarejo V, Correia M, Navarro M, Carretero A, Tafuro S, Rodriguez-Baeza A, Esperanza-Pina JA, Bosch F, Ruberte J. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):5997-6005. doi: 10.1167/iovs.09-3515
6. Lei L, Tzekov R, Tang S, Kaushal S. Accumulation and autofluorescence of phagocytized rod outer segment material in macrophages and microglial cells. *Mol Vis.* 2012;18:103-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265176>
7. Luhmann UF, Robbie S, Munro PM, Barker SE, Duran Y, Luong V, Fitzke FW, Bainbridge JW, Ali RR, MacLaren RE. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Dec;50(12):5934-43. doi: 10.1167/iovs.09-3462
8. Mitchell AJ, Pradel LC, Chasson L, Van Rooijen N, Grau GE, Hunt NH, Chimini G. Technical advance: autofluorescence as a tool for myeloid cell analysis. *J Leukoc Biol.* 2010 Sep;88(3):597-603. doi: 10.1189/jlb.0310184
9. Liu S, Jiang L, Li H, Shi H, Luo H, Zhang Y, Yu C, Jin Y. Mesenchymal stem cells prevent hypertrophic scar formation via inflammatory regulation when undergoing apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2014 Oct;134(10):2648-57. doi: 10.1038/jid.2014.169
10. Yates CC, Nuschke A, Rodrigues M, Whaley D, Dechant JJ, Taylor DP, Wells A. Improved transplanted stem cell survival in a polymer gel supplemented with tenascin c accelerates healing and reduces scarring of murine skin wounds. *Cell Transplant.* 2017 Jan 24;26(1):103-13. doi: 10.3727/096368916X692249

11. Babaei A, Katoonizadeh A, Ranjbar A, Naderi M, Ahmadbeigi N. Directly injected native bone-marrow stem cells cannot incorporate into acetaminophen-induced liver injury. *Biologicals*. 2018 Mar;52:55-58. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.12.006
12. Abdelhamid L, Hussein H, Ghanem M, Eissa N. Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in

- equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*. 2017 Oct;114:225-232. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.05.006
13. Gavrilin VN, Shkurupii VA. Vliianie nakopleniia polivinilpirrolidona v sinusoidal'nykh kletkakh pecheni na kharakter toksicheskogo povrezhdeniia organa. *Biul SO RAMN*. 1995;15(2):24-28.(in Russ.)

#### Адрес для корреспонденции

630090, Российская Федерация,  
г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, д.8,  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН,  
Центр новых медицинских технологий,  
тел.: 8-913-753-0767,  
e-mail: imai@mail.ru,  
Майбородин Игорь Валентинович

#### Address for correspondence

630090, The Russian Federation,  
Novosibirsk, Ac. Lavrentyev Ave., 8,  
Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine,  
Center of Innovative Medical Technologies.  
Tel.: 8-913-753-0767,  
e-mail: imai@mail.ru,  
Igor V. Maiborodin

#### Сведения об авторах

Майбородин Игорь Валентинович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории стволовой клетки, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-8182-5084>

Фигуренко Николай Федорович, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-0430-8673>

Еловский Александр Аркадьевич, врач анестезиолог-реаниматолог-трансфузиолог отделения анестезиологии и реанимации АО «Авиценна», г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-1082-1393>

Михеева Татьяна Владимировна, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0003-2249-5174>

Маслов Роман Владимирович, к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0003-4472-859X>

Майбородина Виталина Игоревна, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных основ патологии, Институт молекулярной патологии и патоморфологии, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Шевела Андрей Иванович, д.м.н., профессор, заведующий отделом «Центр новых медицинских технологий», Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

#### Information about the authors

Maiborodin Igor V., MD, Professor, Chief Researcher of the Stem Cell Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-8182-5084>

Figurenko Nikolay F., PhD, Applicant for Doctor's Degree of the Stem Cell Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-0430-8673>

Elovskiy Aleksandr A., Anesthesiologist-Resuscitator-Transfusologist of the Anesthesiology and Resuscitation Unit, Medical Center "Avicenna", Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-1082-1393>

Mikheeva Tatiana V., PhD, Applicant for Doctor's Degree of the Stem Cell Laboratory, Institute of Chemical Bio Pomatology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0003-2249-5174>

Maslov Roman V., PhD, Applicant for Doctor's Degree of the Stem Cell Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0003-4472-859X>

Maiborodina Vitalina I., MD, Leading Researcher of the Laboratory of Ultrastructural Basis of Pathology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-5169-6373>

Shevela Andrey I., MD, Professor, Head of the Unit "Center of innovative medical technologies", Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, , Novosibirsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-3164-9377>

#### Информация о статье

Получена 9 апреля 2018 г.  
Принята в печать 14 января 2019 г.  
Доступна на сайте 28 февраля 2019 г.

#### Article history

Arrived 09 April 2018  
Accepted for publication 14 January 2019  
Available online 28 February 2019